

PENGARUH PENAMBAHAN ION Fe^{3+} TERHADAP AKTIVITAS XILANASE

DARI *Trichoderma viride*

Ardyan sukma sulistyaningtyas, Sasangka Prasetyawan*, Sutrisno.

Laboratorium Kimia Analitik, Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam,
Universitas Brawijaya, Jl. Veteran Malang 65145

*Alamat korespondensi, Tel : +62-341-575838, Fax : +62-341-575835

Email: sasangka@ub.ac.id

ABSTRAK

Xilanase merupakan enzim yang mengkatalisis reaksi hidrolisis substrat xilan (hemiselulosa) menjadi xilosa. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh penambahan ion Fe^{3+} terhadap aktivitas xilanase dari *Trichoderma viride* dengan menggunakan klobot jagung sebagai bahan induser. Pengaruh penambahan ion Fe^{3+} terhadap aktivitas xilanase ditentukan dengan cara membandingkan antara aktivitas xilanase dengan penambahan ion Fe^{3+} dan aktivitas xilanase tanpa penambahan ion Fe^{3+} . Aktivitas xilanase ditentukan dengan cara mengukur gula pereduksi xilosa secara spektrofotometrik dengan menggunakan reagen asam 3,5-dinitrosalisilat (DNS). Hasil penelitian menunjukkan bahwa penambahan ion Fe^{3+} pada kisaran konsentrasi 5 – 35 mM dapat meningkatkan aktivitas xilanase.

Kata kunci : *Xilanase, Fe^{3+} , Trichoderma viride, Klobot jagung.*

ABSTRACT

Xylanase is an enzyme that catalyzes the hydrolysis reaction substrate xylan (hemicellulose) into xylose. This study was conducted to determine the effect of Fe^{3+} on the activity of xylanase from *Trichoderma viride* using corn strove as an inducers. Effect of the addition of Fe^{3+} ions on xylanase activity was determined by comparing the xylanase activity with the addition of Fe^{3+} ions and xylanase activity without the addition of Fe^{3+} ions. Xylanase activity was determined by measuring the reducing sugar xylose spectrophotometrically using 3,5-dinitrosalisilat acid reagent (DNS). The results showed that the addition of Fe^{3+} ions in the concentration range of 5-35 mM can increase the activity of xylanase.

Keywords: *Xylanase, Fe^{3+} , Trichoderma viride, Corn Strove*

PENDAHULUAN

Xilanase merupakan enzim ekstraseluler, yang berfungsi mengkatalisis reaksi hidrolisis substrat xilan (hemiselulosa) menjadi gula pereduksi xilosa dan xilo-oligosakarida. Xilan merupakan polimer xilosa yang berikatan β -1,4 dengan jumlah monomer 30-100 unit [1]. Xilanase dapat dihasilkan oleh sejumlah mikroorganisme yaitu bakteri, ragi, dan jamur. Salah satu jamur yang dapat menghasilkan enzim xilanase adalah *Trichoderma viride*. Kelebihan *Trichoderma viride* dibandingkan dengan jenis kapang

lainnya, yaitu dapat tumbuh cepat di berbagai substrat, serta mampu berkembang biak pada kondisi pH asam (2,1-2,5) [2,3]. Meskipun enzim yang dihasilkan oleh golongan bakteri mampu bekerja pada temperatur yang lebih tinggi dibanding jamur, namun aktifitas xilanase dari golongan jamur jauh lebih tinggi dari bakteri [4]. Klobot jagung merupakan kulit pembungkus buah dari tanaman jagung yang merupakan limbah pertanian dan selama ini sebagian dimanfaatkan sebagai pakan ternak. Komponen utama serat kasar klobot jagung adalah hemiselulosa (41,16%). Besarnya kandungan hemiselulose ini menyebabkan klobot jagung berpotensi sebagai sumber xilan dalam produksi xilanase.

Menurut [5], Dari hasil penelitian menggunakan beberapa ion logam menunjukkan bahwa peningkatan konsentrasi ion dapat menyebabkan aktivitas xilanase menurun, kecuali ion Fe^{2+} , Cu^{2+} , Ca^{2+} dan Mn^{2+} . Aktivitas xilanase yang diproduksi oleh *Bacillus pumilus* RXA-III5 meningkat dengan penambahan ion Fe^{2+} pada konsentrasi 2, 4, 10 mM dan pada konsentrasi Fe^{3+} yang lebih tinggi belum diketahui [5]. Oleh karena itu dalam penelitian ini dipelajari tentang pengaruh penambahan variasi konsentrasi ion logam Fe^{3+} (5 – 35 mM) terhadap aktivitas xilanase dari kapang *Trichoderma viride* dalam menghidrolisis xilan menjadi xilosa.

METODE PENELITIAN

Bahan dan Alat

Bahan-bahan yang digunakan memiliki derajat kemurnian pro analisa (pa), teknis dan for microbiology. Bahan-bahan kimia yang digunakan antara lain dekstrose, CH_3COOH , CH_3COONa , asam oleat, KH_2PO_4 , FeCl_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, glukosa anhidrat, HCl , BaCl_2 , DNS (asam dinitrosalisilat), Na_2HPO_4 , dan KMnO_4 . Bahan-bahan for microbiology antara lain kentang, pepton, tepung agar, xilan, tepung klobot jagung, kultur murni *Trichoderma viride* dan aquades.

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain erlenmeyer 100 ml dan 500 ml, pipet tetes, pipet ukur 5ml dan 10 ml, pengaduk kaca, tabung reaksi, gelas arloji, labu ukur 100 mL, jarum ose, sentrifuse dingin (Joan MR 1889), magnetik stirer, inkubator (Heraeus Type B 5042), neraca analitik mettler (Bosch PE 620), pH meter (inolab WTW), kuvet, penangas air (Memmert W 200), autoklaf (All American Model 20x0), shaker (Edmund Buhler SM 252413) dan spektronik 20.

Prosedur Preparasi *Trichoderma viride*

Trichoderma viride yang ditumbuhkan dalam media padat miring diinkubasi selama 6 hari (144 jam), kemudian disuspensikan dalam 10 mL akuades steril. Suspensi mikroba diambil sebanyak 2 mL dan ditanam dalam erlenmeyer yang berisi 13 mL media cair steril. Selanjutnya media tersebut diinkubasi dalam shaker selama 36 jam (larutan inokulum) dan dilanjutkan dengan produksi enzim. Untuk memproduksi enzim disediakan 150 mL media cair steril, kemudian dimasukkan ke dalam 2 buah erlenmeyer 250 mL, disterilkan dalam autoklaf selama 15 menit pada temperatur 121°C dan tekanan 15 psi. Kemudian ditambahkan secara aseptis 15 mL larutan inokulum. Selanjutnya media tersebut diinkubasi dalam shaker pada kecepatan 150 rpm pada temperatur kamar hingga jam ke-60, setelah itu dilakukan isolasi enzim. Setelah diinkubasi, enzim xilanase diisolasi dengan menggunakan metode ekstraksi. Ekstraksi dilakukan dengan penambahan 15 mL buffer asetat pH 5,0 lalu dipisahkan dengan sentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 30 menit pada temperatur 4°C. Supernatan yang diperoleh merupakan ekstrak kasar enzim xilanase. Larutan ekstrak kasar enzim selanjutnya dimurnikan dengan cara pengendapan menggunakan garam ammonium sulfat fraksi 80-100%.

Uji Aktivitas Xilanase

Disiapkan 2 buah tabung reaksi lalu masing-masing diisi dengan 1 mL substrat xilan 1% (b/v). Kemudian diinkubasi dalam penangas air 60°C selama 15 menit. Selanjutnya ditambahkan 1 mL ekstrak kasar xilanase dalam tabung 1 dan 1 mL xilanase dalam tabung 2. Lalu masing-masing tabung ditambahkan dengan 5 mL buffer asetat pH 5 dan 1 mL air bebas reduktor. Campuran ini diinkubasi pada temperatur 60°C selama 55 menit, dipanaskan dalam penangas air mendidih selama 15 menit, kemudian didinginkan dengan air mengalir. Setelah dingin ditambahkan 2 mL reagen DNS, dipanaskan dalam penangas air mendidih selama 5 menit, setelah itu didinginkan dengan air mengalir. Larutan dimasukkan dalam labu ukur 25 mL dan ditambahkan akuades hingga tanda batas. Larutan diukur absorbansinya dengan spektrometri UV-Vis pada panjang gelombang maksimum.

Uji Aktivitas Enzim Xilanase Dengan Penambahan Fe^{3+}

Tabung reaksi disiapkan sebanyak 4 buah, masing-masing diisi substrat xilan 1% (b/v) sebanyak 1 mL, setelah itu dipanaskan dalam penangas air pada temperatur 60°C selama 15 menit. Ditambahkan ekstrak kasar xilanase sebanyak 1 mL, kemudian 1 mL buffer asetat pH 5 dan 1 mL air bebas reduktor. Kemudian ditambahkan 1 mL larutan Fe^{3+} 5; 15;

25 dan 35 mM, dan diinkubasi pada temperature 60°C selama 55 menit. Setelah itu, masing-masing tabung dipanaskan pada penangas air mendidih selama 15 menit dan didinginkan dalam air mengalir hingga mencapai temperature kamar. Kadar gula pereduksi xilosa yang terbentuk selama reaksi enzimatis ditentukan secara spektrofotometri menggunakan reagen DNS.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi Ekstrak Kasar Xilanase dari *Trichoderma viride*

Dari hasil penelitian [7],kurva pertumbuhan dari kapang *Trichoderma viride* diketahui bahwa setengah fase eksponensial dicapai pada jam ke-36. Produksi enzim sangat efektif dilakukan pada fase eksponensial karena pada fase ini pertumbuhan biomasa sesuai dengan perhitungan logaritma dan pada saat ini kapang sangat efektif mensintesis enzim untuk memenuhi kebutuhan hidupnya. Tahap awal sebelum melakukan isolasi ekstrak kasar enzim xilanase adalah membuat inokulum sampai jam ke-36 jam dan dilanjutkan dengan produksi enzim xilanase sampai jam ke-60. Enzim xilanase dihasilkan dari kapang *Trichoderma viride* dengan menggunakan induser klobot jagung. Pada tahap selanjutnya proses isolasi ekstrak kasar enzim yang dilakukan dengan menggunakan metode sentrifugasi, yaitu dengan penambahan buffer asetat 0,2 M pH 5,0 sebanyak 15 mL ke dalam 2 buah erlenmeyer yang masing-masing berisi 150 mL media cair. Kemudian dipisahkan dengan menggunakan sentrifugasi dingin dengan kecepatan 3000 rpm, suhu 4°C selama 30 menit. Penambahan buffer asetat berfungsi untuk mempertahankan kestabilan enzim dan untuk meningkatkan kelarutan protein sehingga mempermudah dalam pemisahannya dari molekul-molekul lainnya yang tidak dapat larut, seperti sisa-sisa jaringan sel dan tepung klobot jagung yang digunakan sebagai induser. Kemudian larutan di senrifusgasi dingin. Secara umum sentrifusgasi dingin merupakan proses pemisahan dengan menggunakan gaya sentrifugal sebagai *driving force*. Sehingga dari proses sentrifusgasi menghasilkan endapan dan supernatan yang merupakan ekstrak kasar xilanase. Selanjutnya, dilakukan fraksinasi dengan menggunakan ammonium sulfat, dengan tingkat kejenuhan 80-100%. Fraksinasi merupakan salah satu proses pemurnian protein melalui pengendapan. Fraksinasi ini dilakukan berdasarkan prinsip *salting out* dimana kelarutan protein akan menurun pada konsentrasi garam yang tinggi. Kelarutan ion-ion garam lebih besar dari pada protein sehingga ion garam akan menarik molekul air yang mensolvasi protein enzim sehingga kelarutan protein enzim akan semakin kecil dan mengendap. Garam ammonium

sulfat dipilih karena bersifat mudah larut dalam air dan tidak menyebabkan perubahan aktivitas walaupun konsentrasinya cukup tinggi.

Penentuan Aktivitas Xilanase

Xilanase adalah enzim yang dapat mengkatalisis reaksi hidrolisis xilan menjadi xilosa. Mekanisme kerja dari xilanase adalah memutus ikatan glikosida pada hemiselulosa. (xilan) menjadi monomer xilosa.

Aktivitas xilanase ditentukan dengan cara mengukur gula pereduksi yang dihasilkan selama reaksi enzimatis secara spektrofotometri menggunakan reagen DNS atau asam 3,5-dinitrosalisilat. Aktivitas xilanase dinyatakan dengan satuan μg gula pereduksi yang dapat dihasilkan oleh 1mL enzim xilanase tiap menit (unit). Gula pereduksi xilosa akan mereduksi asam dinitrosalisilat membentuk kompleks warna merah kecoklatan sebagai kompleks warna dari asam-3-amino-5-nitrosalisilat, kemudian diukur absorbansinya pada $\lambda = 495 \text{ nm}$. Kadar gula pereduksi yang dihasilkan sebanding dengan aktivitas xilanase. Semakin tinggi kadar gula pereduksi maka aktivitas xilanase juga akan semakin tinggi.

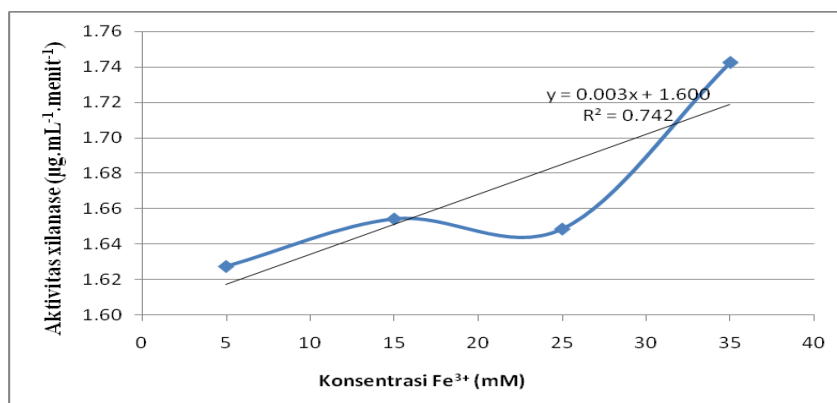
Tabel: Aktifitas enzim xilanase

Fraksi enzim	Konsentrasi gula pereduksi($\mu\text{g/mL}$)	Aktivitas enzim($\mu\text{g/mL.menit}$)
Ekstrak kasar	44,016	1,6652
Ekstrak kasar fraksi 80-100%	38,016	1,4382

Berdasarkan tabel di atas, diketahui bahwa aktivitas enzim xilanase pada fraksi 80-100% yakni 1,4382 unit, lebih kecil dibandingkan dengan aktivitas ekstrak kasar xilanase. Hal ini disebabkan adanya fraksinasi dengan garam ammonium sulfat menyebabkan kadar protein pada fraksi 80-100% lebih rendah dari kadar protein pada larutan ekstrak kasar enzim.

Pengaruh Penambahan Ion Fe^{3+} Terhadap Aktivitas Xilanase

Pengaruh penambahan ion Fe^{3+} terhadap aktivitas xilanase ditentukan dengan cara mengukur aktivitas enzim pada berbagai variasi konsentrasi penambahan Fe^{3+} pada xilanase fraksi 80-100%. Hasil yang diperoleh ditunjukkan pada gambar berikut:



Gambar. Kurva aktivitas xilanase fraksi 80-100% pada variasi konsentrasi penambahan Fe³⁺

Berdasarkan gambar di atas diketahui bahwa sampel yang mengandung ion Fe³⁺ dengan konsentrasi 5, 15, 25, dan 35 mM memberikan peningkatan aktivitas xilanase. Sehingga ion Fe³⁺ dikatakan berperan sebagai activator. Hal ini kemungkinan karena Fe³⁺ merupakan logam yang bersifat asam lewis (akseptor elektron) seperti halnya ion H⁺ dari gugus -COOH asam glutamat yang mempermudah penyerang ion karboksilat dari asam aspartat terhadap ion C₁ yang mengikat atom O pada ikatan glikosidik polimer xilan. Ion Fe³⁺ ini akan terikat pada dua sisi aktif enzim dari rantai samping asam glutamat. Ion Fe³⁺ akan menerima pasangan elektron bebas atom O selanjutnya akan terhidrolisis oleh H₂O yang menyebabkan ikatan glikosidik polimer xilan terputus dan membentuk gula pereduksi (xilosa) yang merupakan monomer dari xilan. Ikatan Fe³⁺ dengan sisi aktif enzim ini dapat mempengaruhi struktur enzim sehingga xilanase dapat berfungsi secara maksimal dalam proses hidrolisis xilan menjadi xilosa. Ion Fe³⁺ juga dapat berperan sebagai stabilisator [9], karena ion Fe³⁺ dapat membantu menstabilkan keadaan transisi pada reaksi antara enzim dengan substrat sehingga kompleks enzim substrat yang terbentuk tidak dapat terurai kembali menjadi enzim dan substrat dan cenderung bereaksi kekanan membentuk produk gula pereduksi (xilosa).

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian yang telah dilakukan dapat diambil kesimpulan bahwa pada penambahan ion Fe³⁺ pada konsentrasi 5, 15, 25 dan 35 mM dapat meningkatkan aktivitas xilanase, sehingga Fe³⁺ pada kisaran konsentrasi tersebut masih berperan sebagai activator.

DAFTAR PUSTAKA

1. Reilly, P.J., 1991, *Xylanase: Structure and Function*. In Hollander, A. (Ed). *Proceeding of A Symposium on Trend in Biotechnology of Fermentation for Fuels and Chemicals*, Plenum Press, New York.
2. Muhtadi, D., Palupi, N.S. dan M. Astawan, 1992, *Enzim Dalam Industri Pangan*, IPB, Bogor.
3. Girindra, A., 1933, *Biokimia I*, Gramedia, Jakarta
4. Budiman, A., dan Setyawan, 2011, **Pengaruh konsentrasi Substrat, Lama Inkubasi, dan pH dalam Proses Isolasi Enzim Xylanase dengan Menggunakan Media Jerami Padi**, Jurusan Teknik Kimia Fakultas Teknik Universitas Diponegoro, Semarang.
5. Richana, N., 2002, **Produksi dan Prospek Enzim Xilanase dalam Pengembangan Bioindustri di Indonesia**, Jurnal AgroBio 5(1):29-36, diakses tanggal 25 mei 2009
6. Ratanakhanokchai, K., K.L Kyu, and M. Tanticharoen., 1999. **Purification and properties of a xylan-binding edoxylanase from alkaliphilic *Bacillus* sp. Strain K-1**. J. Appl. Environ. Microbal. 65(2):694-697. diakses tanggal 25 mei 2009
7. Widyasari, Siska., 2008, **Isolasi dan Karakterisasi Ekstrak Kasar Xilanase dari *Trichoderma viride***, *Skripsi*, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya, Malang.
8. Yong-Eok, L., S.E. Lowe, B. Henrissat and J. G. Zeikus, 1993, *Charactrization of The Active Site and Thermostability Regions of Endoxylanase from *Thermoanaerobacterium Saccharolyticum* B6A-RI*, *Journal of Bacteriology* 175(18):5890-5898, diakses tanggal 12 April 2010
9. Lehninger, L. A., 1982, **Dasar-dasar Biokimia**, Erlangga, Jakarta